第37卷 第4期 昆虫学报 Vol. 37, No. 4
1994年11月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Nov., 1994

球形芽孢杆菌 C_3-41 对致倦库蚊的毒效及在蚊体内的再循环

袁志明 张用梅 刘娥英 陈宗胜 蔡全信
(中国科学院武汉病毒研究所，武汉 430071)

摘要 球形芽孢杆菌 C_3-41 菌株 (*Bacillus sphaericus* C_3-41) 对致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 幼虫有很高毒效，对2龄和3—4龄幼虫的半致死剂量 (LD_{50}) 分别为63.1 和89.7芽孢/蚊幼虫。处理浓度越高，取食时间越长，蚊幼虫取食到的杀蚊活性物质量越多，死亡率越高。当蚊幼虫取食亚致死剂量杀蚊活性物质后，球形芽孢杆菌在感染的活幼虫体内不增殖；但当蚊幼虫取食致死剂量杀蚊活性物质后，蚊幼死亡，球形芽孢杆菌在死蚊幼虫体内增殖明显，6天内芽孢从感染初期的 1.86×10^2/蚊幼虫增加到 1.59×10^6/蚊幼虫。芽孢在死蚊幼虫体内能正常萌发、生长、产孢和形成毒素。增殖的芽孢同样对致倦库蚊幼虫有较高毒力。

关键词 球形芽孢杆菌 C_3-41 菌株 致倦库蚊 再循环

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 是一种对蚊幼虫有较强毒杀作用的蚊虫病原菌，对库蚊 (*Culex*) 和一些按蚊 (*Anopheles*) 幼虫毒效高，使用剂量较大时，对伊蚊 (*Aedes*) 幼虫也有一定的毒杀作用。关于球形芽孢杆菌原粉和不同制剂对不同蚊种的毒效已在实验室和不同环境条件的野外蚊幼虫孳生地中进行了考查。很多实验证明，在野外蚊幼虫孳生地，包括重度污染水体，球形芽孢杆菌的杀蚊活性可保持较长时间，这除同杀蚊毒素的持效期相关外，也同芽孢在死蚊幼虫体和孳生地水体中的再循环有关。

同时，很多直接的证据也证明，国外分离到的高毒力菌株球形芽孢杆菌1593和2362都能在库蚊、按蚊体内和孳生地水体中再循环 (Davidson 等，1984; Charles 和Nicolas, 1986; Des Rochers 和 Garcia, 1984; Mulla 等，1984)，甚至在其它水生节肢动物体内增殖 (Karch 等，1990)。

球形芽孢杆菌 C_3-41 是我国分离的一株对蚊幼虫高毒力菌株，属血清型 H_{5a5b} (张用梅等，1987)。近几年，C_3-41 杀蚊幼乳剂已在全国进行了大面积野外应用，该制剂不仅对蚊幼虫毒力高，而且持效期长，对不同环境孳生地蚊幼的控制取得了良好的应用防治效果。

本研究的目的就是在实验室条件下考查球形芽孢杆菌 C_3-41 菌株对致倦库蚊 (*C. quinquefasciatus*) 的毒效，芽孢在蚊幼体内的再循环及其对杀蚊毒效的影响。

本文于1993年2月收到。

材料和方法

一、样品

球形芽孢杆菌 C_3-41 杀蚊幼乳剂是我室用 C_3-41 菌株采用液体深层发酵，经后处理工艺制备，含芽孢数 4.9×10^9/ml，效价 200ITU/μl。

二、球形芽孢杆菌 C_3-41 对致倦库蚊的毒效

1. 不同浓度球形芽孢杆菌处理不同时间对致倦库蚊的毒效

将 50 头实验室饲养的 3—4 龄致倦库蚊幼虫分别置于装有 200ml 含不同浓度（0.1、0.5、1.0、10、100 和 1000×10^{-6}）C_3-41 杀蚊幼乳剂的白瓷碗中，在 26±1℃ 下分别处理 5.0、10、20、40、60、120 和 240 分钟，然后用滤网滤去处理液，经处理的蚊幼虫用 5% 乙醇洗涤一次后，再用无菌水洗涤三次，放入 200ml 无菌水中，25 头蚊幼虫/碗。以不经球形芽孢杆菌处理的蚊幼虫经 5% 乙醇和无菌水洗涤后放入无菌水中作对照，定时加食，检查 24 和 48 小时死亡蚊幼虫，计算校正死亡率。

2. 球形芽孢杆菌对不同龄期致倦库蚊幼虫的毒效

将 25 头 2 龄和 3—4 龄致倦库蚊幼虫放入装有 200ml 0.1×10^{-6} C_3-41 乳剂的白瓷碗中，每个处理时间 4 个重复，两个用于蚊幼虫取食芽孢的计数，两个用于蚊幼虫死亡率的检查。蚊幼虫分别处理 10、20、40、60、120 和 240 分钟后，用5%乙醇和无菌水洗涤。将两个重复的 50 头蚊幼虫用无菌研钵破碎后，稀释涂布在选择性培养基上(蛋白胨 1%，酵母膏 0.3%，牛肉膏 0.5%，$MgSO_4\cdot6H_2O$0.02%，硫酸链霉素 100μg/ml，叠氮钠 100μg ml，pH7.2)，30℃ 培养 48—72 小时，计数、镜检细菌形态，计算出芽孢/蚊幼虫数。

将另两个重复蚊幼虫分别放入 200ml 无菌水中，对照处理同前，26±1℃，定时加食，检查 24 和 48 小时死亡蚊幼虫，计算出校正死亡率。

三、球形芽孢杆菌在致倦库蚊幼虫体内再循环

将 100 头 3—4 龄致倦库蚊幼虫用 0.5ppm C_3-41 制剂处理 1 小时，用滤网滤出蚊幼虫，用 5% 乙醇和无菌水洗涤后，放入 200ml 无菌水中，26±1℃，定时加食，共 12 个重复。在蚊幼虫经处理后不同时间（2、4、6、8、10、12、24 和 48 小时），分别取 50 头活蚊幼虫于无菌研钵中破碎，然后稀释涂布在选择性培养基上，48—72 小时计数，镜检细菌形态，计算出不同时间蚊幼虫体内残存的球形芽孢杆菌菌数。

将死蚊幼虫挑出放入另一装无菌水的容器中，不同时间解剖死蚊幼虫，涂片观察球形芽孢杆菌在死蚊幼虫体内的生长和发育，并摄影。同时在不同时间（0、2、4、6、8、10 和 20 天），取 50 头死蚊幼虫于无菌研钵中破碎后稀释涂布在选择性培养基上，48—72 小时计数，镜检细菌形态，计算不同时间死蚊幼虫体内增殖的球形芽孢杆菌菌数。

四、生物测定

1. 蚊幼虫破碎液的制备

取 50 头死亡 6 天蚊幼虫于无菌研钵中破碎，镜检 90% 菌体已分化为孢子囊末期，部分芽孢脱落，定容至 50ml(1.59×10^6 芽孢/ml)，备用。

2. 生物测定方法

按 WHO(1985) 提供的标准生物测定方法。

结 果

一、球形芽孢杆菌对致倦库蚊幼虫的毒效

球形芽孢杆菌 C_3-41 杀蚊幼乳剂对致倦库蚊幼虫的致死作用随处理浓度的提高和处理时间的延长而增大(图 1)。

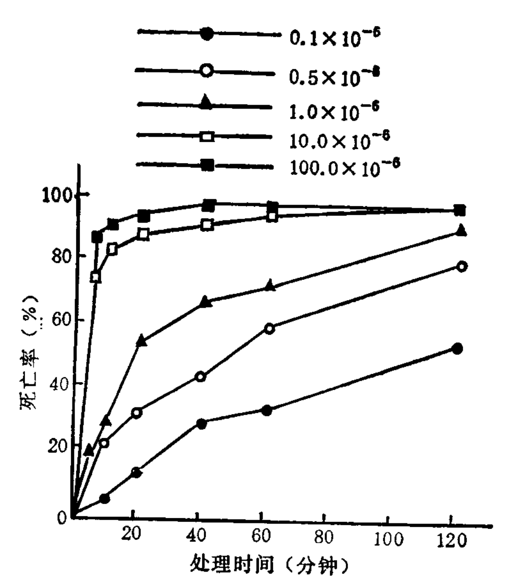


图 1 球形芽孢杆菌 C_3-41 对致倦库蚊的致死作用

0.1ppm 制剂处理 10 分钟，蚊幼虫 48 小时死亡率只有 2%； 处理 4 小时死亡率为 92%，同处理 48 小时的死亡率(98%)相近；而在 100ppm 制剂中处理 10 分钟，48 小时死亡率可达 92%，即高浓度条件下，蚊幼虫只需取食球形芽孢杆菌几分钟就可导致死亡。根据蚊幼虫不同的取食时间和不同取食时间下的死亡率，计算出在 0.1、0.5、1.0 和 10ppm 浓度下导致 90% 蚊幼死亡的取食时间(LT_{90})分别为 199、181、103 和 37.8 分钟。可以看出，导致 90% 蚊幼虫死亡的取食时间随处理浓度的升高而缩短。

将 2 龄和 3—4 龄幼虫置于 0.1×10^{-6} C_3-41 制剂中处理不同时间，随着处理时间的延长，蚊幼虫取食的球形芽孢杆菌芽孢数逐渐增多，而且 3—4 龄幼虫在相同处理浓度和取食时间条件下取食的芽孢数明显高于 2 龄幼虫取食的芽孢数(表 1)。 当蚊幼虫取食一定量的杀蚊活性物质后，就会导致中毒反应，蚊幼虫对外界刺激反应迟钝、群集、痉挛，最后死亡。由于虫龄对杀蚊活性物质的敏感性有差异，所以不同虫龄的半致死剂量 (LD_{50}) 随虫龄的增大而提高。球形芽孢杆菌 C_3-41 对 2 龄和 3—4 龄蚊幼虫 48 小时的半致死剂量分别为 63.1 和 89.7 芽孢/蚊幼虫。

表 1 球形芽孢杆菌 C_3-41 对 2 龄和 3—4 龄致倦库蚊的毒效*

虫龄	项目 \ 结果 \ 取食时间(分)	10	20	40	60	120	240	LD_{50}	LD_{90}	r	回归式 aX + b
2 龄	取食芽孢/蚊幼虫	25.2	36.6	74.6	86.6	94.6	96.2	63.1	95.1	0.99	−29.4X+1.26
	校正死亡率(%)	2.0	20.0	54.0	84.0	91.5	92.0				
3—4 龄	取食芽孢/蚊幼虫	38.0	41.3	92.5	121.0	143.0	149.0	89.7	147.9	0.99	−11.6X+0.69
	校正死亡率(%)	6.0	24.0	54.0	74.0	82.0	92.0				

* 48 小时结果。

二、球形芽孢杆菌在致倦库蚊幼虫体内再循环

将 3—4 龄致倦库蚊幼虫在 0.5×10^{-6} C_3-41 制剂中处理 1 小时，由于蚊幼的取食作用,体内的芽孢数在 1 小时内急剧上升,此时将取食了球形芽孢杆菌芽孢的蚊幼虫转移到清水中,由于蚊幼虫在清水中正常的取食和排泄作用,球形芽孢杆菌芽孢和菌体也会部分从活蚊幼虫体内排出,蚊幼体内的球形芽孢杆菌菌数缓慢下降,至 48 小时,活蚊幼虫体内的球形芽孢杆菌菌数下降至 40 菌数/蚊幼虫以下（图 2)。这说明球形芽孢杆菌在活蚊幼虫体内不增殖或增殖不明显。

当蚊幼虫受杀蚊活性物质作用致死后,球形芽孢杆菌芽孢很快在死蚊幼虫体内萌发、生长和产孢。镜检结果表明，球形芽孢杆菌在蚊幼虫死亡 0—8 小时芽孢萌发，8—72 小时营养体生长旺盛(图版 I:2)，72—96 小时菌体分化，形成明显棒状孢子囊，96 小时后芽孢开始脱落(图版 I:3)，死亡 7 天的蚊幼虫体内,球形芽孢杆菌几乎全部分化形成芽孢(图版 I:4)， 同时在死幼虫体内也能观察到其它非球形芽孢类杆菌生长。在未经球形芽孢杆菌处理的对照死亡组蚊幼虫体内,死亡 48 小时后可见大量非球形芽孢类杆菌生长旺盛(图版 I:1)。用选择性培养基也分离不到球形芽孢杆菌菌株。

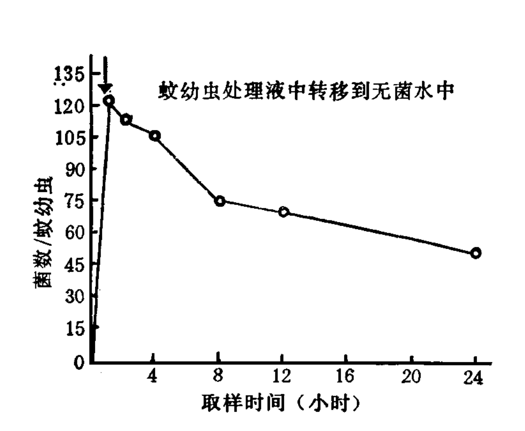


图 2　球形芽孢杆菌在活蚊幼虫体内的消长

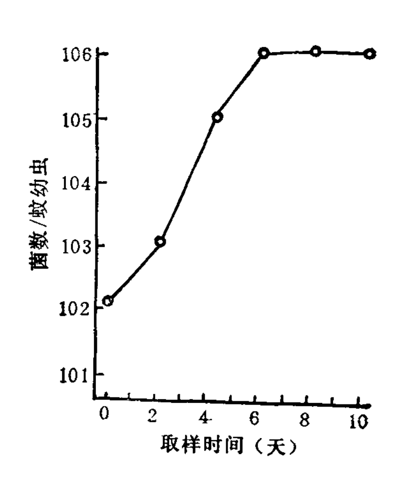


图 3　球形芽孢杆菌在死蚊幼虫体内的增殖

球形芽孢杆菌在死蚊幼虫体内增殖十分显著， 6 天内，抗热性芽孢从死亡初期的 1.86×10^2/蚊幼虫增殖到 1.59×10^6/蚊幼虫，随着蚊幼虫尸体的裂解，体内的芽孢数略有下降(图 3)。另外,在蚊幼虫死亡 20 天，也未观察到体内增殖的芽孢再次萌发和生长,菌数也未再次大幅度升高,这说明球形芽孢杆菌在死蚊幼虫体内只能完成一次再循环。

三、增殖芽孢对致倦库蚊幼虫的毒效

将蚊幼虫组织破碎液和 C_3-41 制剂用于 3—4 龄致倦库蚊的生物测定，结果见表 2。从中可以看出,在死蚊幼虫体内增殖的球形芽孢杆菌芽孢的毒力比 C_3-41 制剂芽孢的毒力高,两者对致倦库蚊 3—4 龄幼虫 48 小时的 LC_{50} 值分别为 55.6 和 58.8 芽孢/ml。

表 2 增殖芽孢和 C_3-41 制剂对致倦库蚊幼虫毒性比较*

样品	浓度和结果						LC50 (芽孢/ml)	LC90 (芽孢/ml)	r	回归式 aX + b
死蚊幼虫破碎液	浓度(芽孢/ml)	158.0	79.0	39.5	19.8	9.9	55.6	121.5	0.90	16.2X+0.61
	校正死亡率(%)	98.0	94.0	45.0	18.0	12.2				
C_3-41 制剂	浓度(芽孢/ml)	245.0	98.0	49.0	24.5	12.2	58.8	187.2	0.87	31.7X+0.31
	校正死亡率(%)	98.0	86.0	56.0	36.0	16.0				

* 48 小时结果。

讨 论

致倦库蚊幼虫在水中是过滤性取食。蚊幼虫取食到的球形芽孢杆菌杀蚊活性物质量主要决定于其取食层杀蚊活性物质含量、蚊幼虫的取食时间和取食速度 (Priest, 1992)。因此,在一定球形芽孢杆菌浓度和环境条件下,蚊幼虫取食时间越长,取食的杀蚊活性物质量越多,死亡率越高。但由于蚊幼虫生理性和龄期的差异,不同代和不同龄期的蚊幼虫在相同条件下取食的杀蚊活性物质量不一样。像 2 龄和 3—4 龄幼虫在 0.1ppm 球形芽孢杆菌处理液中取食 60 分钟,两者取食的芽孢数分别为 86.6 和 121.0/蚊幼虫,48 小时死亡率分别为 84% 和 74%。尽管 3—4 龄幼虫在相同时间内取食的芽孢数比 2 龄幼虫多,但由于不同龄期蚊幼虫对杀蚊活性物质敏感性差异,死亡率反而较低,两者 48 小时的半致死剂量 (LD_{50}) 分别为 89.7 和 63.1 芽孢/蚊幼虫。

在球形芽孢杆菌制剂的应用中,一般认为蚊幼虫必须长时间取食杀蚊活性物质才会取得良好的灭蚊效果。本研究结果表明,蚊幼虫死亡主要是由于蚊幼虫取食致死量杀蚊活性物质所致。球形芽孢杆菌浓度越高,蚊幼虫取食时间越长,蚊幼虫取食的杀蚊活性物质量越多,死亡率越高。例如在 0.1、0.5、1.0、10.0×10^{-6} C_3-41 制剂中,蚊幼虫取食 20 分钟,48 小时死亡率分别为 24.0、68.0、86.0 和 92.0%。同时,球形芽孢杆菌浓度越高,蚊幼虫取食到致死量杀蚊活性物质所需时间越短。例如在 0.1、0.5、1.0 和 10.0ppm C_3-41 制剂中,蚊幼虫取食到导致 90% 蚊幼虫死亡 (24 小时)的杀蚊活性物质所需时间 (LT_{90}) 分别为 199、181、103 和 37.8 分钟,即在高浓度条件下,蚊幼虫只需取食几十分钟、甚至几分钟即可导致死亡。因此,球形芽孢杆菌制剂在用于流水孳生地蚊幼虫的控制中,只要使用剂量大,蚊幼虫在短时间内也会取食到致死量杀蚊活性物质而取到良好的防治效果。但由于水流动会带走部分杀蚊活性物质,因而持效期较短(张用梅等,1989)。

已经证明,国外分离的高毒力的球形芽孢杆菌 1593 和 2362 菌株能在库蚊和按蚊幼虫体内再循环,其再循的芽孢数随蚊种、孳生地水质的不同而不同 (Davidson 等,1984; Charles 和 Nicolas, 1986; Des Rochers 和 Garcia, 1984)。本实验通过显微镜直接观察和测定死蚊幼虫体内增殖的球形芽孢杆菌菌数直接证明了 C_3-41 菌株能在致倦库蚊幼虫体内完成一个再循环周期。在取食亚致死剂量杀蚊活性物质的活蚊幼虫体内,尽管有报道球形芽孢杆菌芽孢可以萌发 (Davidson 等,1984; Nicolas 等,1987b),但由蚊幼体内的新陈代谢活动阻止了球形芽孢杆菌的生长、繁殖;当蚊幼虫取食致死量杀蚊活性物质后,蚊幼虫死亡,芽孢在死蚊幼虫体内正常萌发、生长、产孢和形成毒素。在蚊幼虫死亡

第六天，死蚊幼虫体内的芽孢数从感染初期的 1.86×10^2/蚊幼虫增殖到 1.56×10^6/蚊幼虫。这同其它作者报道的增殖量相近 (Charles 和 Nicolas, 1986; Nicolas 等, 1987b, Ramosa 和 Hopkins, 1981)。同时，再循环芽孢的毒力比 C_3-41 制剂中芽孢毒力略高，这说明死蚊幼虫体内存在适合球形芽孢杆菌芽孢正常萌发、生长、产孢和毒素形成所必需的营养和生长条件。

尽管球形芽孢杆菌芽孢能在致倦库蚊死蚊幼虫体内增殖 10^4 倍，而且增殖的芽孢也对蚊幼虫有较高毒力，但蚊幼虫在死后会很快沉入水底，蚊幼虫体内增殖的芽孢只能最后随死蚊幼虫的裂解而释放到周围水中，因而增殖的芽孢不会在蚊幼虫取食层而进一步取得杀蚊效果。只有在下雨、水流动或机械搅动情况下，球形芽孢杆菌芽孢才会部分重新悬浮而滞留在蚊幼虫取食层而取到杀蚊效果 (Nicolas 等, 1987a)。所以，尽管球形芽孢杆菌制剂是一种有效杀蚊剂，但在深水孳生地蚊幼虫体内的再循环对其杀蚊效果影响不大。同时孳生地水温、水质、水深 pH 和其它浮游生物的存在都会影响再循环的发生及菌体在死蚊幼虫体内的生长、产孢和毒素形成，这些都需今后进一步研究。

参　考　文　献

张用梅等　1987　两株高毒力球形芽孢杆菌的分离。杀虫微生物 **1**: 98—101。

张用梅等　1989　影响球形芽孢杆菌 C_3-41 杀蚊幼乳剂野外杀虫效果因素及药效评价。中华流行病学杂志 **10**(7): 20—30。

Charles, J.F. & L. Nicolas 1986 Recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 in mosquito larvae: a laboratory study. *Ann. Microbiol.* (*Inst. Pasteuer*) **137B**:101—11.

Davidson, E.W. et al. 1984 Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 125—9.

Des Rochers, B. & R. Garcia 1984 Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*. Mosq. News 44:160—165.

Karch, S. et al. 1990 Control of *Culex pipiens* by *Bacillus sphaericus* and of nontarget arthropods in its recycling. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **6**: 47—54.

Mulla, M.S. et al. 1984 Efficacy and persistence of the microbiol agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae in organically enriched habitats. *Mosq. News* **44**:166—73.

Nicolas, L. et al. 1987a Efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 against larvae of *Anopheles gambiae* under laboratory and field conditions in West Africa. *Med. Veterin. Entomol.* **1**:157—62.

Nicolas, L. et al. 1987b Persistence and recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**:243—5.

Priest, F.G. 1992 Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* **72**: 357—69.

Ramosa, W.A. & T.L. Hopkins 1981 Effects of mosquito larval feeding behavior on *Bacillus sphaericus* efficacy. *J. Invertebr. Pathol.* **37**: 269—72.

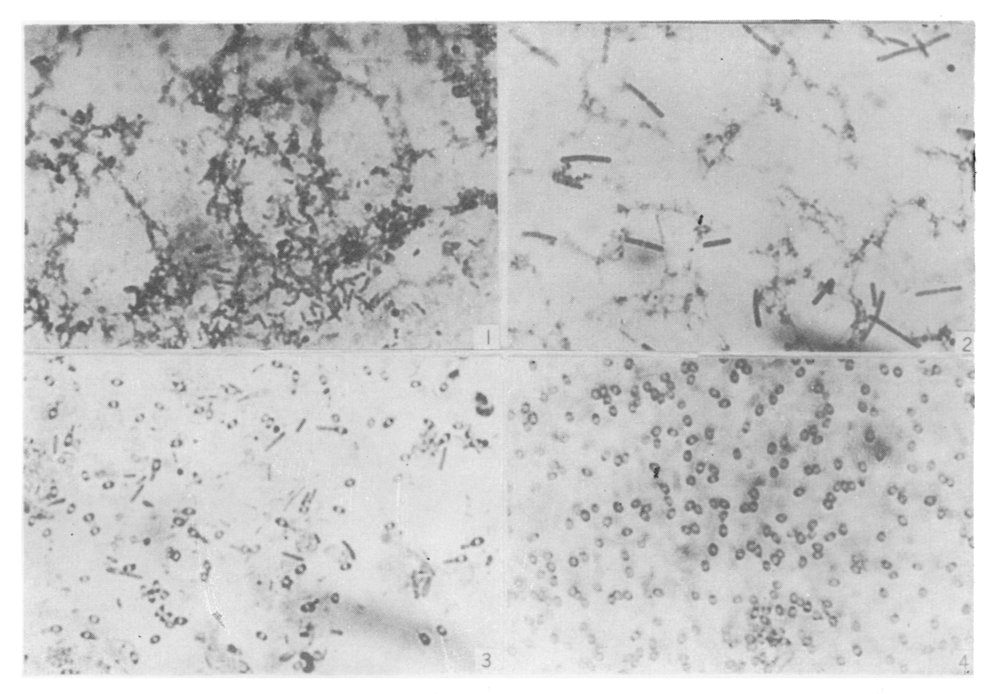
WHO 1985 Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. TDR/BCV/SPHAERICUS/85. 3 pp. 20—21. Geneva.

EFFICACY OF *BACILLUS SPHAERICUS* C_3-41 AGAINST *CULEX QUINQUEFASCIATUS* AND ITS RECYCLING IN CADAVERS

YUAN ZHI-MING ZHANG YONG-MEI LIU E-YING CHEN ZONG-SHENG CAI QUAN-XIN
(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan* 430071)

The efficacy of *Bacillus sphaericus* C_3-41 to control the larvae of *Culex quinquefasciatus* was evaluated in the laboratory. The result indicated that the strain C_3-41 was a very effective control agent against the mosquito larvae. The 50% lethal dosage (LD_{50}) against the second to fourth larval instar were found to be 63.1 and 89.7 sporesper larva respectively. The larvicidal substance ingested by larvae seemed to be directly proportional to the concentration of C_3-41 and duration of feeding time. When larvae ingested sub-lethal dosage of *B. sphaericus*, its recycling could not occur in the living larvae. However, when the larvae ingested lethal dosage, they died within 48 hours and recycling of the bacteria occurred immediately. The number of spores increased from initial 1.86×10^2 to 1.59×10^6 sporesper larva within six days after the death of the larvae. The spores germinated, multiplied, sporulated and forming toxin normally in larval cadavers. The spores yielded in larval cadavers were highly toxic to the mosquito larvae.

Key words *Bacillus sphaericus* C_3-41——*Culex quinquefasciatus*——recycling



1.对照处理组死蚊幼虫体内非球形芽孢类细菌生长　×2500　2.蚊幼虫死亡 56 小时，球形芽孢杆菌在蚊幼虫体内生长、繁殖　×2500　3.蚊幼虫死亡 96 小时，体内球形芽孢杆菌芽孢部分脱落，可见棒状孢子囊　×2500　4.蚊幼虫死亡 7 天，体内球形芽孢杆菌全部形成芽孢　×2500